

Dioktil Adipat'ın (DOA) *Labidochromis caeruleus*'un Fryer, 1956 (Cichlidae, Teleostei) Solungaç Histolojisi Üzerine Etkileri ^[1]

Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ * Özlem ÖNEN ** ✍ Gürsel ERGEN *
Melih ÜRETEN * Emrah BOZ * Kenan SEFEROĞLU * Burak GÖKÇE *

[1] Bu çalışma Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından hazırlanan Deney Hayvanları İçin Etik Kurul Kararlarına göre ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu 2008-49 Sayılı Raporu uyarınca yürütülmüştür.

* Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova, İzmir - TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, 36000 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-933

Özet

Dioktil adipat (DOA), ikincil plastikleştirici olarak başta polivinil ve diğer polimerler olmak üzere birçok maddenin üretiminde kullanıldığı halde ekotoksikolojik etkileri hakkında çok az bilgi vardır. Subletal düzeyde ve kısa süreli DOA maruziyetinin *Labidochromis caeruleus*'un (sarı prenses) solungaçları üzerindeki birincil etkilerinin belirlenmesi amacıyla balık örnekleri iki kontrol ve bir deneme grubu olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. 30 günlük deneme süresi sonunda solungaç dokuları histolojik olarak incelenmiştir. 0.75 ppm DOA uygulanan deneme grubundan alınan doku örnekleri, hiçbir uygulama yapılmayan ve 2.5 ppm aseton uygulanan kontrol grupları ile karşılaştırıldığında; hipertofi, ciddi ölçüde hiperplazi, anevrizma, ödem ve çarpıcı füzyon olarak ayırt edilen histopatolojik değişimler gösterdikleri izlenmiştir. Sonuçlar, DOA'nın bir çevre kirleticisi olarak daha fazla dikkate alınması gerektiğini işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: Dioktil adipat, DOA, *Labidochromis caeruleus*, Histopatoloji, Solungaç

The Effects of Dioctyl Adipate (DOA) on the Gill Histology of *Labidochromis caeruleus* Fryer, 1956 (Cichlidae, Teleostei)

Summary

Although it is used widely as a second plasticizer in processing polyvinyl and other polymers, the data about the ecotoxicological effects of dioctyl adipate (DOA) is limited. In order to investigate the primer effects of short term sublethal exposure to DOA on the gills of *Labidochromis caeruleus* (yellow princess), the specimens were divided into three groups included two control and one experimental group. After a period of 30-days, the tissues were removed for histological examination. When compared to the untreated and 2.5 ppm acetone exposed controls, the gills of the experimental animals that exposed to 0.75 ppm DOA showed remarkable histopathological changes distinguished as hypertrophy, severe hyperplasia, aneurysma, oedema, epithelial lifting, and striking fusion. The results indicate that DOA would have to take into more consideration as an ecotoxicant.

Keywords: Dioctyl adipate, DOA, *Labidochromis caeruleus*, Histopathology, Gill

GİRİŞ

Dioktil adipat (DOA) [bis (2-ethylhexyl) adipate, C₂₂H₄₂O₄]; n-oktanol ve adipik asidin esteri olup PVC başta olmak üzere vinil plastiklerde esnekliği artıran ikincil plastikleştirici olarak çok yaygın biçimde kullanılır. Özel-

likle gıda ambalajı, tıbbi ürünler ve kozmetikler, su geçirmez giysiler ve yer döşemeleri gibi birçok materyalin üretim süreçlerinde, uygun esneklik ve dayanıklılık elde edilmesini sağlayan fiziksel ve kimyasal özellikler taşımaktadır.

✍ **İletişim (Correspondence)**

☎ +90 232 3884000/2420

✉ ozlem.onen@hotmail.com

Felder ve ark.¹ DOA'nın suda çok düşük olan çözünürlüğünü (0.78 mg/L) akut toksisitesinin olmadığına ilişkin bir kanıt olarak değerlendirip, çözünür miktarın 10.000 kat üzerindeki değerlerin bile balıklar üzerinde akut toksik etki yapmadığını bildirilmişlerdir. ABD Çevre Koruma Kurumu (EPA)², DOA için içme suyunda bulunabilecek maksimum miktarı 0.4 mg/L olarak vermektedir. DOA'nın aktif çamurda 2.7 gün olarak çok hızlı olan yarılanma ömrü, çok düşük uçuculuğu nedeniyle suda 160 güne çıkmakta ve suda hidrolize olmadığı bildirilmektedir². EPA raporlarına göre, besinlerine çok yüksek dozlarda (12.000 ve 25.000 ppm) DOA eklenen dişi farelerde karaciğer tümörleri oluşumu artmaktayken, sıçan ve köpeklerde tümör oluşmamaktadır. DOA, tavşanlarda deri ve gözde çok hafif iritasyon yapmaktadır. Kobaylarda böyle bir durum belirlenmemiştir. Fare ve sıçanlarda fertilité, üreme ve gelişim üzerinde olumsuz etkileri olmakla beraber genotoksik olmadığı not edilmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC) ölçütlerinde Grup 3 içerisinde değerlendirilmektedir³. DOA'nın ucuz bir hammadde olarak çok yaygın ve çekincesiz kullanımı, bu sınırlı veriler çerçevesinde ancak "temkinli yaklaşım" ilkesiyle değerlendirilebilir. EPA², DOA'nın alg ve balıklar üzerinde akut toksik etkisinin olmadığını, ancak *Daphnia magna*'da toksik etkiler gösterdiğini bildirmektedir. Aynı rapora göre, içme suları için kabul edilen standardın üzerindeki kronik maruziyet durumunda, insan sağlığının etkilenebileceği; ağırlık kaybı, kemik kütlelerinde azalma, testis ve karaciğerde bozulma olabileceği not edilmiştir. İnsan dışındaki canlılar için kronik maruziyetin etkilerine dair veri olmadığından, söz konusu kimyasalın çevre sağlığı açısından daha ayrıntılı değerlendirilmesi gerektiği açıktır.

Bu çalışma; renkli, hareketli, bakımı ve üretmesi kolay, dayanıklı bir akvaryum balığı türü olarak ekonomik değer taşıyan *Labidochromis caeruleus* solungaçlarında DOA'nın histopatolojik etkilerinin araştırılması ve sözkonusu kimyasalın ekotoksikolojik özelliklerine ışık tutulabilmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL ve METOT

Araştırmamız Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından hazırlanan Deney Hayvanları İçin Etik Kurul Kararlarına göre ve Ege Üniv Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu 2008-49 Sayılı Raporu uyarınca yürütülmüştür. Ticari akvaryumculardan sağlanan onbeş adet erkek *L. caeruleus* örneği (ağırlık 3±0.5 gr; boy 8±2 cm) dört hafta süreyle 20 L hacmindeki cam akvaryumlarda, 25±1°C su sıcaklığında, 7.7-8.5 pH'da ve doğal fotoperiyotta tutulduktan sonra beşer örnekten oluşan iki kontrol ve bir deneme grubuna ayrılmışlardır. Balıklar iki günde bir ticari yemlerle (Sera-San) beslenmişlerdir. DOA örneği (CAS

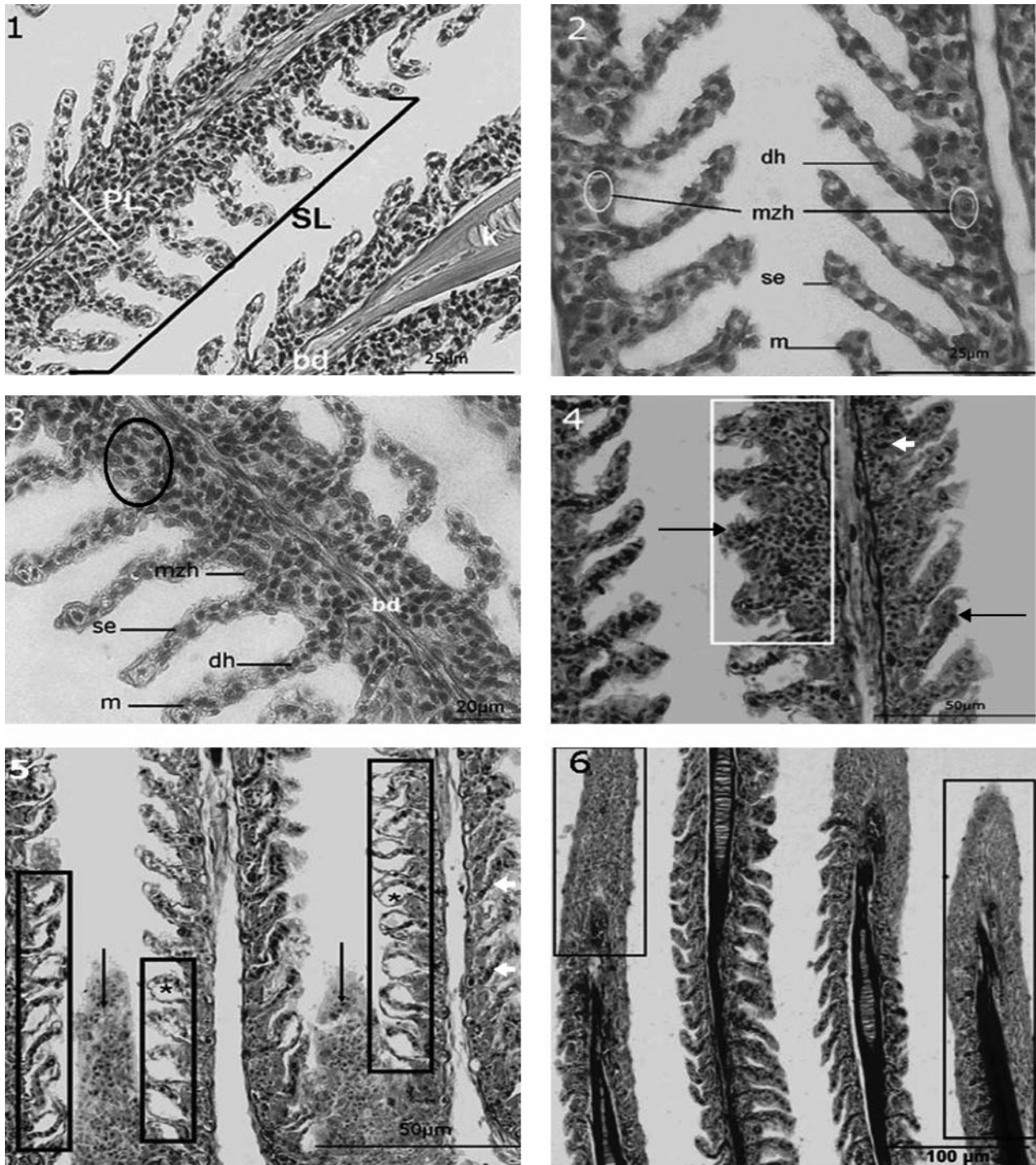
Number 103-23-1) Plastifay AŞ. (İstanbul) tarafından sağlanmıştır. İlk kontrol grubuna hiçbir kimyasal verilmiştir. Deneme grubunun bulunduğu akvaryuma çözücü madde olarak aseton kullanılıp, asetonda sürekli karıştırılarak hazırlanan 0.75 ppm DOA uygulanmıştır. Yalnızca çözücü madde içeren kontrol grubuna ise 2.5 ppm aseton, sudaki yarı ömrü olan yedi günde bir eksilen kısmı tamamlanmak suretiyle eklenmiştir. 30 günlük deneme süresi bittiğinde MS222 ile anesteziyen sonra kontrol ve deneme gruplarından alınan solungaç dokuları Bouin sıvısında tesbit edilip parafine gömülmüştür. Baird-Tatlock marka mikrotomla alınan 5-7 µ kalınlığındaki kesitler hematoksil-eozin (H&E) ve Mallory Trikrom (MT) boyama yöntemleriyle boyanıp, Olympus CX 51 ışık mikroskobunda incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

BULGULAR

Tüm gruplardaki balıklarda herhangi bir fiziksel deformasyon, yüzme ve beslenme davranışlarında değişim ve ölüm kaydedilmemiştir. Kıkırdak ve bağ dokusuyla desteklenmiş deri türevleri olan solungaçlar, damar donanımları çok zengin organlardır. Solungaç yaylarına bağlanan primer lameller ekseninde, solunum yüzeyini artıran filamentöz yapıdaki sekonder lamellerden oluşurlar (*Şekil 1/1*). Lamellerin bir-iki sıralı basit yassı solunum epiteliyle döşeli oldukları belirlenmiştir. Epitelin arasında iri ve yuvarlak nükleuslarıyla mukus hücreleri yer alır. Daha iç kısımlarda destekleyici hücreler bulunur. İyon değişimi yaptıkları için mitokondrice zengin olan hücreler (klorid hücreler), büyüklükleri ve açık renkli olmaları ile diğer hücrelerden kolayca ayırt edilirler (*Şekil 1/2*).

Aseton uygulanan kontrol grubunda sadece çok hafif bir hiperplazi izlenirken solungaçların genel yapısı ve hücrelerinde deformasyon yoktur (*Şekil 1/3*).

DOA uygulanan grupta çarpıcı değişimler izlenmiştir. Öncelikle, destek hücrelerinin hipertrofiye olmasından kaynaklanan ve primer lamellerden başlayarak sekonder lamellere doğru ilerleyen, belirgin bir hiperplazi saptanmıştır (*Şekil 1/4*). Lamel şekillerinde bozulma genel bir olgudur. Hiperplazik lamellerde epitelin yer yer aşındığı tespit edilirken, mukus hücreleri ayırt edilememiştir. Sekonder lamellerde ödem oluşmasına bağlı olarak balonlaşmalar (anevrizma) meydana gelmiştir (*Şekil 1/5*). Anevrizma izlenen kesitlerde, primer lamellerdeki hiperplazinin adeta kabarma, şişme denilebilecek kadar arttığı ve damarların genişlediği gözlenmiştir. Ayrıca damarlarda dilatasyon olduğu belirlenmiştir. En ilginç değişim ise bazı sekonder lamellerde apikalden başlayarak ilerleyen kaynaşmalar (füzyon) olarak ortaya konmuştur (*Şekil 1/6*). Füzyon, bazen sekonder lamelin tamamında izlenebilmektedir.



Şekil 1. 1- Kontrol grubunda solungaçların genel yapısı. PL- primer lamel; SL-sekonder lamel, bd-bağ dokusu, k-kıkırdak, H&E, 2- Kontrol grubunda solungaç epiteli. dh-destek hücreleri, mzh-mitokondriyum zengini hücreler, se-solunum epiteli, m-mukus hücresi, H&E, 3- Aseton kontrol grubunda solungaç epiteli. Destek hücrelerinde çok hafif hiperplazi (daire içerisinde), H&E, 4- DOA uygulanan grupta sekonder lamellerde belirgin hiperplazi (dikdörtgen içerisinde), destek hücrelerinde hipertrofi (beyaz ok) ve epitelde aşınmalar (siyah oklar), H&E, 5- DOA uygulanan grupta yaygın anevrizma (dikdörtgen içerisinde), ödem (*); damarlarda genişleme (beyaz oklar) ayrıca destek hücrelerinde çok çarpıcı hiperplazi (siyah oklar), MT, 6- Sekonder lamellerde solda apikal, sağda total füzyon (dikdörtgen içerisinde), MT

Fig 1. 1- General structure of the gills in the control group. PL- primary lamellae; SL- secondary lamellae, bd- connective tissue, k- cartilage, H&E, 2- Epithelia in the gills of the control group. dh- pillar cells, mzh- mitochondria-rich cells, se- respiratory epithelium, m- mucous cell, H&E, 3- Epithelial cells in the gills of the acetone control group. A slight hyperplasia in the pillar cells (circled), H&E, 4- Significant hyperplasia at secondary lamellae in DOA exposed group (rectangled), hypertrophy in the pillar cells (white arrow) and eruption of the epithelium (black arrows), H&E, 5- Widened aneurysm in DOA exposed group (rectangled), edema (*) and dilatation (white arrows), note also striking hyperplasia in pillar cells (black arrows), MT, 6- Apical (on the left) and total (on the right) fusions (rectangled) at the secondary lamellae, MT

TARTIŞMA ve SONUÇ

Solungaçların histolojik yapısının, sudaki toksik kimyasallara karşı özgül olmamakla beraber çok yüksek duyarlılık gösterdiği iyi bilinen bir olgudur ⁴. Lipofilik fitalat esterleri içeren sentetik deniz suyunun, balıklarda bazen toksisite oluşturabileceği de rapor edilmiştir ⁵, fakat DOA'nın balıklardaki etkilerine yönelik araştırma sayısı yok denecek kadar azdır. Bu çalışmada DOA'nın *L. caeruleus* solungaçlarında histopatolojik etkiler oluşturduğu ilk kez ortaya konulmuştur. Aseton kontrol grubunda çok hafif hiperplazi dışında belirgin bir histopatoloji saptanamaması, etkilerin DOA'dan kaynaklandığının belirteci.

L. caeruleus'da DOA maruziyetiyle oluşan hipertrofi ve hiperplazi; petrol hidrokarbonları, insektisidler, pestisidler ve ağır metaller gibi çeşitli kimyasallara maruz kalan birçok türde rapor edilenlere ⁶⁻⁹ benzerdir. Çeşitli kimyasalların etkisiyle oluşan karsinojenite, teratojenite ve mutajenite, sadece ilk maruziyet yüzeyi olan solungaçlarda değil, daha kolay bir izleme yöntemi olan eritrosit mikronukleus oluşum frekansı artışı ile de belirlenebilir ¹⁰.

Sunulan çalışmada suya eklenen DOA ile, organizmanın ilk karşılaştığı yüzey olan solungaçlarda; özellikle destek hücrelerinde çok çarpıcı, mitokondri zengin hücrelerde de belirgin biçimde izlenen hiperplazi, uygulamadan en çok bu iki grup hücrenin etkilendiğini göstermektedir. Bu çalışmada sayılarının artması ve irileşmeleri beklenen mukus hücrelerinin kesitlerde ayırt edilemez hale gelmeleri, DOA'ya gösterilen tepkinin mukus salgısının artmasıyla karakterize edilemeyeceğini düşündürmektedir. Ancak kesitlerin tümü 30 günün sonunda alınmıştır ve histopatoloji daha kısa sürede gerçekleşmiş olabilir. Bu noktada, çeşitli kimyasallara tepki bağlamında artan mukus miktarının ^{4,11} bir biyokimyasal bariyer oluştururken, tüm solunum yüzeylerinde oksijen geçişimini de belli ölçülerde engelleyeceği öne sürülebilir.

Lamellar epitelde hiperplazi ve hipertrofi, savunma amaçlı olarak sucul ortamdaki kimyasalların dolaşıma geçiş mesafesini artıran fiziksel bariyer oluşturma süreçleridir. Lamellar füzyon da maruziyet yüzeyini daraltarak bu bariyeri yapısal anlamda destekler. Böylece çok iyi damarlanmış olan solunum yüzeyleri kalınlaşır, daralır ve kimyasalların kan dokusuna geçmesi bir ölçüde engellenebilir ⁵. Doku fizyolojisinde değişim ve aksaklıkları primer düzeyde belirleyen histopatolojik parametreler olarak yaygın anevrizma ve ödem, hipertrofi ve hiperplaziyle birlikte değerlendirildiğinde; solungaçlarda kan akımına bağlı işlevlerin, farklı yöntemler kullanılarak detaylarıyla araştırılması gerekmektedir.

EPA raporlarına göre ², ABD'de 1987-1993 yılları arasında doğaya 204 ton DOA boşaltılmıştır. Çekincesiz

kullanım uzantısında, bu miktarın son yıllarda artmış olduğu kesindir. Diğer ülkelerdeki deşarj konusunda da bir bilgiye ulaşılamamıştır. Bir teleost türü olarak *Lepomis macrochirus*'da yapılan araştırmalara göre DOA'nın biyokonsantrasyon faktörü 27 olarak verilmekte ve bu değerini adipatları metabolize edemeyen su canlıları için önemli olabilecekken, balıklar için çevresel anlamda önemli olmadığı bildirilmektedir. Bu durumda, çeşitli su ürünlerinin uzun süreli tüketiminde ortaya insan sağlığı açısından nasıl bir tablo çıkacağı belli değildir. DOA, ağız yoluyla alındığında hızla ve tamamen absorbe edilmekte ve neyse ki hızla metabolize olarak atılmaktadır ³. Ancak özellikle işçi sağlığı açısından kronik maruziyet, çevre sağlığı açısından da üretim ve nakliyyede oluşabilecek kazalar dikkatle değerlendirilmelidir. DOA'nın çevresel etkileri konusunda daha ayrıntılı araştırmalara gereksinim olduğu açıktır. Bu çalışma ile elde edilen veriler, bu etkilerin sanıldığı kadar önemsiz olmayacağını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Felder JD, Adams WJ, Saeger VW: Assessment of the safety of dioctyl adipate in freshwater environments. *Environ Toxicol Chem*, 5, 777-784, 1986.
2. Anonymous - US EPA: Technical factsheet on: Di (2-ethylhexyl) adipate. *Nation Primary Drink Water Reg*, 141,13-61, 2006.
3. Anonymous - IARC: Summaries & Evaluations, di(2-ethylhexyl) adipate. *IARC*, 77, 149-154, 2000.
4. Akaishi FM, Silva AHC, Jakobi SCG, Eiras SDR, St-Jean SD, Courtenay SC, Lima EF, Wagener ALR, Scofield AL, Oliveira RCA: Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (wsf) of crude oil. *Arch Environ Contamin Toxicol*, 46, 244-253, 2004.
5. Moeller PDR, Morton SL, Mitchell BA, Sivertsen SK, Fairey ER, Mikulski TM, Glasgow H, Deamer-Melia NJ, Burkholder JM, Ramsdell JS: Current progress in isolation and characterization of toxins isolated from *Pfiesteria piscicida*. *Environ Health Perspect*, 109, 739-743, 2001.
6. Mazon AF, Cerqueira CCC, Fernandes MN: Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ Res*, 88, 52-63, 2002.
7. Ortiz JB, Canales MLG, Sarasquete C: Histopathological changes induced by lindane (γ -hch) in various organs of fishes. *Sci Marina*, 67 (1): 53-61, 2003.
8. Machado MR, Fanta E: Effects of organophosphorus methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Brazil Arch Biol Technol*, 46 (3): 361-372, 2003.
9. Al-Attar AM: The influences of nickel exposure on selected physiological parameters and gill structure in the teleost fish, *Oreochromis niloticus*. *J Biol Sci*, 7 (1): 77-85, 2007.
10. Özkan O, Gül S, Keleş O, Aksu P, Kaya T Ö, Nur G: The investigation of the mutagenic activity of Kars River sediments on *Orthrias angorae* (Steindachner, 1897). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (1): 35-40, 2009.
11. Nero V, Farwell A, Lister A, Van Der Kraak G, Lee LEJ, Van Meer T, MacKinnon MD, Dixon DG: Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol Environ Safety*, 63, 365-377, 2006.